动 物 学 研 究 2004, Oct. 25 (5): 456-459 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

三色书虱体内共生微生物 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的分子检测

董 鹏，王进军*
(西南农业大学 植物保护学院，昆虫学及害虫控制工程重点实验室，重庆 400716)

摘要：采用常规 PCR 和巢式 PCR 方法对三色书虱 *Liposcelis tricolor* 体内的共生微生物 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行分子检测；通过 *Wolbachia* 的通用引物以及 A、B 亚群引物分别比较了常规 PCR 和巢式 PCR 对 *wsp* 基因扩增的灵敏性。从三色书虱体内扩增出了 610 bp 的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段，500 bp 的 *Wolbachia* A 亚群的 *wsp* 基因片段和 450 bp 的 *Wolbachia* B 亚群的 *wsp* 基因片段。扩增结果说明三色书虱被 A 和 B 两个亚群的 *Wolbachia* 混合感染；巢式 PCR 比常规 PCR 更为灵敏。

关键词：三色书虱；*Wolbachia*；*wsp*；常规 PCR；巢式 PCR
中图分类号：Q969.31 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2004)05-0456-04

Molecular Detection of *Wolbachia wsp* Gene in *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae)

DONG Peng, WANG Jin-jun*
(*The Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China*)

Abstract: Nested polymerase chain reaction (PCR) and standard PCR amplification of the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gene were used to assay the infection of the population of *Liposcelis tricolor* by endosymbiotic *Wolbachia*. The sensitivity of standard PCR was compared with that of nested PCR in monitoring *Wolbachia* in *L. tricolor* by using the universial primers of *wsp* gene and the primers of A and B subgroup. About 610 bp region of *Wolbachia wsp* gene, 500 bp region of *Wolbachia* A subgroup *wsp* gene and 450 bp region of *Wolbachia* B subgroup *wsp* gene were sequenced from this host population. The result suggested that this tested population of *L. tricolor* was infected by two strains of *Wolbachia* and nested PCR possessed a higher sensitivity.

Key words: *Liposcelis tricolor*; *Wolbachia*; *wsp*; Standard PCR; Nested PCR

昆虫共生微生物 *Wolbachia* 由于与宿主重要的进化过程有关、并对宿主的生殖等行为具有调控作用，以及具有作为外源基因的载体等应用前景，近年来引起国际昆虫学界和媒介生物学界的广泛关注(Bourtzis et al, 1998)。*Wolbachia* 是首先在尖音库蚊 *Culex pipens* 的生殖组织中发现的 (Hertig & Wolbach, 1924)，是一种很难在体外培养的立克次体(O'Neill et al, 1995)。以 PCR 为基础的分子检测技术的研究表明，*Wolbachia* 在 16% ~ 24% 的昆虫中都有分布 (Werren, 1997; Werren & Windsor, 2000)，并通过卵的细胞质进行母系遗传。该立克次体可以通过多种方式调控其宿主的生殖活动(Stouthamer et al, 1999)。有个别的 *Wolbachia* 株系还有缩短成虫寿命的作用 (Min & Benzer, 1997)。目前应用于 *Wolbachia* 系统发育和分类、检测和鉴定研究的主要有 16*S* rDNA、23*S* rDNA、*ftsZ* 和

收稿日期：2004-05-27；接受日期：2004-08-02
基金项目：国家自然科学基金资助项目 (39800017)；霍英东青年教师基金资助项目 (71022)；重庆市骨干教师计划资助项目
* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jjwang7008@yahoo.com

wsp 基因。其中 *wsp* 基因是编码 *Wolbachia* 的一种表面蛋白（surface protein），是目前报道的 *Wolbachia* 基因中进化最快的一种，可以作为了解 *Wolbachia* 对宿主感染的分子基础（Zhou et al，1998）。Werren et al（1995）根据 *Wolbachia* 的 16*S* rDNA 的序列差异把节肢动物体内的 *Wolbachia* 分成 A 和 B 两个类群；Zhou et al（1998）依据 *wsp* 基因的序列，对有代表性的 28 个 *Wolbachia* 品系进行了系统发育和 PCR 分类方法的研究，并根据不同 *Wolbachia* 品系的 *wsp* 基因序列将 *Wolbachia pipientis* 分成 12 个组，分别属于 A 和 B 两个亚群。

三色书虱（*Liposcelis tricolor*）属于虱啮目（Psopotera）书虱科（Liposcelididae）书虱属（*Liposcelis*）（Badonnel，1973）。主要存在于土壤、地表、储藏的粮食和室内。严重危害储粮及面粉加工品，还可以传播真菌和细菌（Kallinovic，2000）。本文应用 PCR 技术对该虫体内共生微生物 *Wolbachia* 的感染情况进行了检测，旨在了解 *Wolbachia* 对宿主感染的分子基础，为书虱的综合治理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试虫及来源

三色书虱（*Liposcelis tricolor*）采自山东省菏泽市储藏高粱中。在实验室温度 26 ℃、湿度为 80% 的
全黑暗条件下，用全麦粉:脱脂奶粉:酵母粉 = 10:1:1 的人工饲料饲养以建立种群。

1.2　书虱总 DNA 的制备

取 20 头三色书虱成虫用 70% 的乙醇清洗两遍，再用双蒸灭菌水清洗一遍后，在液氮条件下充分研磨。用 300 μL DNA 裂解液（100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，50 mmol/L NaCl，50 mmol/L EDTA，1% SDS，0.15 mmol/L 精胺，0.5 mmol/L 亚精胺）把研磨好的材料冲洗到 1.5 mL 的离心管内，加入 2 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），50 ℃水浴 5 h，接着 95 ℃水浴 10 min。用水饱和酚（pH 8.0）和氯仿:异戊醇（24:1）抽提 1 次，9 000 r/min 离心 10 min，上清液中加入 0.2 倍体积的醋酸铵和两倍体积的无水乙醇，－20 ℃下沉淀 2 h 后离心，沉淀用 70% 乙醇洗涤，沉淀晾干后加入 20 μL 双蒸灭菌水溶解，4 ℃下保存备用。

1.3　PCR 检测三色书虱体内的 *Wolbachia*

依据 Zhou et al（1998）设计的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的引物为 81F：5′-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC；136F：5′-TGA AAT TTT ACC TCT TTT C；691R：5′-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA；522R：5′-AAC AGC TTT TGC TTG ATA。其中 81F 与 691R 为 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的通用引物，136F 与 691R 为 A 亚群引物，81F 与 522R 为 B 亚群引物（Zhou et al，1998）。常规 PCR 扩增体系为 20 μL，包括 10.8 μL ddH_2O、2 μL 10 × Taq Buffer、2 μL 25 mmol/L $MgCl_2$、2 μL 2.5 mmol/L dNTPs、1 μL 10 μmol/L 的上游和下游引物、0.2 μL 5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶、1 μL 的模板（约 10 ng）。扩增条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。巢式 PCR 扩增体系为 20 μL，取通用引物的常规 PCR 扩增产物 1 μL 作为模板，其他试剂的组成和终浓度与常规 PCR 扩增相同。扩增条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，50 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。取常规 PCR 和巢式 PCR 的扩增产物各 10 μL，用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

2　结果与分析

2.1　三色书虱体内 *Wolbachia* 的 PCR 检测结果

使用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的通用引物 81F 和 691R 扩增出了 610 bp 的目的片段（图 1a）。理论上该引物扩增的片段大小应在 590 ~ 632 bp，因此本研究的检测结果与理论值一致，表明在我们所采集的三色书虱菏泽种群体内存在 *Wolbachia*。

2.2　三色书虱体内 *Wolbachia* 的双重感染

应用 A 亚群引物 136F 与 691R 扩增出了 500 bp 的特异性条带，B 亚群引物 81F 与 522R 扩增出了 450 bp 的特异性条带（图 1b）。扩增片段的大小与理论值相符，表明三色书虱菏泽种群被 A、B 两个亚群的 *Wolbachia* 复合感染。

2.3　两种扩增方法的比较

使用通用引物 81F 与 691R 经过常规 PCR 扩增后，虽然得到一条 610 bp 的目的片段，但条带非常弱（图 1a：2），不利于判断三色书虱体内是否感染 *Wolbachia*；而经过巢式 PCR 第二次扩增后条带明显增亮（图 1b：2），说明目的片段的数量明显增多。使用A亚群引物136F与691R进行常规PCR

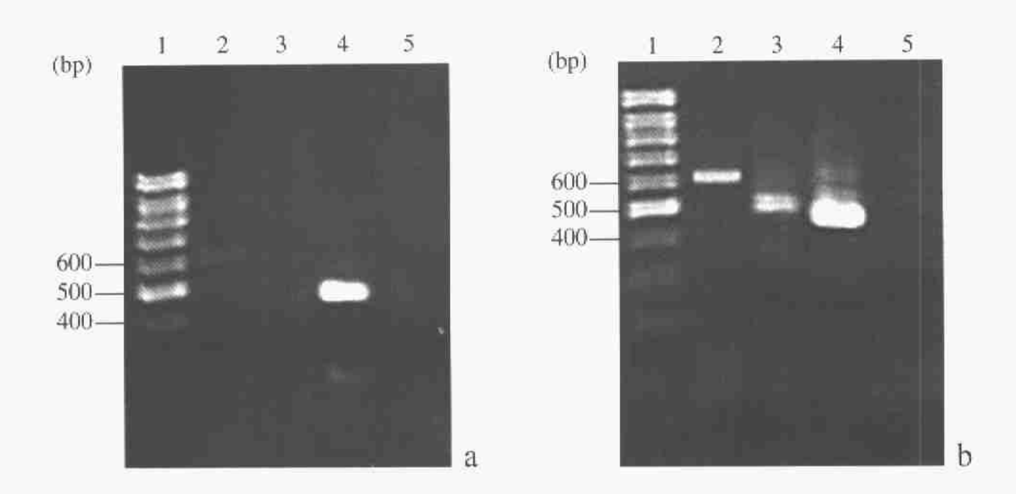


图 1 三色书虱体内 *Wolbachia* 感染的常规(a)和巢式(b)PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of standard (a) and nested (b) PCR products of *Wolbachia* from *Liposcelis tricolor*

1. DNA 相对分子量标准(Molecular size standards);2. 通用引物 81F、691R(Universal primers 81F, 691R);3. A 亚群引物 136F、691R(Primers of A group 136F, 691R);4. B 亚群引物 81F、522R(Primers of B group 81F, 522R);5. 空白(水)对照(No DNA control)。

扩增后,看不到相应的目的条带(图 1a:3),而巢式 PCR 扩增结果可以看到比较明显的目的条带(图 1b:3)。以上结果说明巢式 PCR 在一定程度上弥补了常规 PCR 的不足,提高了对目的片段扩增的灵敏性,检测更加准确。

3 讨 论

自然界中昆虫体内 *Wolbachia* 复合感染的情况非常普遍。例如,伊蚊 *Aedes albopitus* 大多携带两种明显不同的 *Wolbachia*(Armbruster et al, 2003),有两种果蝇均被 3 种 *Wolbachia* 同时感染(Vavre et al, 1999),有 94% 的日本绿豆象(*Callosobruchus chinensis*)携带 3 种不同的 *Wolbachia*(Kondo et al, 2002)。本文的结果表明三色书虱菏泽种群也被 A、B 两亚群的 *Wolbachia* 复合感染。在复合感染的昆虫体内,不同品系 *Wolbachia* 存在的部位及密度有所不同,而且在同一个寄主体内不同的 *Wolbachia* 之间不会产生竞争(Mouton, 2003)。

PCR 扩增实验中模板 DNA 的浓度、非模板 DNA 和其他一些限制性因子的存在可能会对扩增的结果产生一定影响,甚至出现假阴性。利用常规 PCR 对二点叶螨体内感染的 *Wolbachia* 进行检测时就出现了阴性的现象(Jeyaprakash & Hoy, 2000)。而巢式 PCR 由两次扩增反应组成,经过第一次通用引物的扩增,相对降低了 PCR 扩增中的一些限制性因子对第二次扩增的影响。所以巢式 PCR 比常规 PCR 有更高的灵敏性。

参考文献:

Armbruster P, Damsky WE, Giordano R, Birungi J, Munstermann LE, Conn JE. 2003. Infection of new- and old-world *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: Implications for host mitochondrial DNA evolution [J]. *Journal of Medical Entomology*, **40** (3): 356-360.

Badonnel A. 1973. Psocoptères de grèce [J]. *Bidogia gallo-hellen*, **4**: 139-146.

Bourtzis K, Dobson SL, Braig HR, O'Neill SL. 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overloaded [J]. *Nature*, **265**: 1081-1090.

Hertig M, Wolbach SB. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects [J]. *Journal of Medical Research*, **44**: 329-374.

Jeyaprakash A, Hoy MA. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species [J]. *Insect Molecular Biology*, **9** (4): 393-405.

Kondo N, Ijichi N, Shimada M, Fukatsu T. 2002. Prevailing triple infection with *Wolbachia* in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) [J]. *Molecular Ecology*, **11**: 167-180.

Min KT, Benzer S. 1997. *Wolbachia* normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**: 10792-10796.

Mouton L, Henri H, Bouletreau M, Vavre F. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects [J]. *Molecular Ecology*, **12**: 3459-3465.

O'Neill SL, Pettigrew MM, Andreadis TG. 1995. An *in-vitra* system for culturing *Wolbachia* symbionts of arthropods [J]. *Journal of*

Cellular Biochemistry, **21A**: 210.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. 1999. *Wolbachia* pipienti: Microbial manipulator of arthropod reproduction [J]. *Annual Review of Microbiology*, **53**: 71 - 102.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 1711 - 1723.

Werren JH, Windsor DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium [J]. *Proceedings of the Royal Society of London*, *Series B*, **267**: 1277 - 1285.

Werren JH, Zhang W, Guo LR. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods [J]. *Proceedings of the Royal Society of London*, *Series B*, **261**: 55 - 63.

Werren JH. 1997. Biology of *Wolbachia* [J]. *Annual Review of Microbiology*, **42**: 587 - 609.

Zhou W, Rousset R, O'Neill SL. 1998. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences [J]. *Proceedings of the Royal Society of London*, *Series B*, **265**: 1 - 7.